

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0298

研究課題名（和文）慢性的低酸素環境において遺伝子発現を決定する選択的転写機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Selective gene expression machinery during prolonged phase of hypoxia(Fostering Joint International Research)

研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA, Koh)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：10451923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：低酸素応答の急性期と慢性期に働く遺伝子の発現を制御する分子機序を、それらの核内のポジションに着目して解析した。急性期と慢性期の低酸素応答で発現が誘導される遺伝子約200個を、HIFの標的遺伝子、および、CREBの標的遺伝子の中から選抜して、その核内ポジションを、共同研究者が開発したHIPMap法を用いて決定した。その結果、低酸素下で発現変動する複数の遺伝子が、核内ポジションを変化させていることが明らかになった。このことから、低酸素環境は、遺伝子の核内での位置も変化させることで、ダイナミックな遺伝子発現を調節していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the molecular machinery of gene expression during acute and prolonged phase of hypoxia by focusing on its nuclear position. We first picked up about 200 genes which is up-regulated during hypoxic response in a HIF- or CREB-dependent manner. Probes for these genes were synthesized and their nuclear positions were determined by HIPMap method. This analysis indicated that multiple genes which change expressions in hypoxia, also change their nuclear position. These results indicate that dynamic changes in the gene expression during hypoxia are also co-related with their nuclear positions.

研究分野：分子医科学

キーワード：低酸素応答 遺伝子発現 転写 染色体構造

1. 研究開始当初の背景

生体は、低酸素環境下において、低酸素応答を引き起こし、恒常性を維持する。低酸素下ではエネルギー産生が制限されるため、低酸素適応に必要な遺伝子を選択的に発現させる機構が存在していると考えられる。しかし、その実態は明らかになっていない。申請者は、慢性的な低酸素環境で活性化される転写因子 CREB に着目して、低酸素特異的な遺伝子発現の分子機構の解析を行ってきた。これまでの解析から、CREB の標的遺伝子は PKA を介した典型的経路と低酸素経路では異なり、低酸素特異的に発現制御を受けるものが存在することが明らかになってきた。この低酸素特異性を決定する機構には、CREB 自身の制御の他に、CREB 標的遺伝子のクロマチン構造の変化なども重要な働きをすることが考えられる。しかしながら、その分子機構はこれまでほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

基課題に該当する基盤研究 C において CREB が低酸素下で選択的な転写を示す分子機構として、以下の解析を計画した：(1) CREB の翻訳後修飾 (2) CREB の細胞内局在 (3) CREB と相互作用する分子の同定 (4) CREB 標的遺伝子のクロマチン構造。とりわけ、低酸素下におけるクロマチン構造には未知の点が多いため、(4) に関しての詳細な解析が必要とされている。クロマチン構造の解析には従来からの 3C 法や FAIRE 法を用いることを計画していたが、これらは標本中の全細胞を一緒にして解析するために、特定の細胞集団で引き起こされる微細な変化は検出できないという問題が考えられた。この問題点を克服するためには、一細胞レベルで核内の遺伝子配置を決定しクロマチン構造を明らかにする必要がある。このことを可能にする最先端技法が、米国 NIH の共同研究者らによって high-throughput imaging position mapping (HIPMap) 法として開発された手法である。そこで、本国際共同研究では HIPMap 法を実施して、高解像度のデータを得ることで、上記の問題点を克服し、クロマチンの構造変化が担う低酸素特異的な遺伝子発現の分子機構を解明することを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) 低酸素応答性遺伝子の空間配置を決定する HIPMap 法プローブの作製

代表的な低酸素応答性遺伝子の選抜

空間配置を決定する約 200 個の遺伝子を選抜した。主たる解析対象である CREB 標的遺伝子について、申請者がこれまでに行ったアレイ解析と次世代シーケンズ解析より同定した低酸素応答性の遺伝子 100 個、ならびに、文献ですでに報告されている典型的経路

で誘導される遺伝子 50 個の、計 150 個を選抜した。また、CREB 標的遺伝子とは別に、代表的な低酸素応答性遺伝子についても 50 個程度選抜した。

HIPMap 法プローブの設計と調製

a. で選抜した 200 遺伝子の空間配置を決定するために、多種の蛍光プローブを調製した。既に共同研究先で確立されている高効率プローブ作製法のアルゴリズムを利用して、プローブを設計し、大規模な合成と精製を行った。

(2) 低酸素と典型的経路による活性化を比較した CREB 標的遺伝子の核内空間配置の決定

低酸素培養細胞の調製

乳がん細胞株を 384 穴プレートに播き、通常酸素、急性期低酸素(6 時間)、慢性期低酸素(48 時間)条件で、低酸素ワークステーション内で培養して、試料を調製した。

低酸素と典型的経路のそれぞれの CREB 標的遺伝子の核内の位置の決定

(1) で調製したプローブを用いて、低酸素経路・典型的経路での CREB 標的遺伝子、ならびに、低酸素応答性遺伝子の核内の位置決定を行った。

遺伝子の空間的配置と遺伝子発現の相関解析

核内の遺伝子の空間配置(座標を振り数値化)ならびに、遺伝子間の距離を、各条件間で比較して、低酸素下でクロマチン構造の変化を引き起こしたものを抽出した。次に、それらの遺伝子の、空間配置と発現との相関を解析した。また、同時に CREB の免疫染色も実施して、クロマチン構造の変化領域に CREB が共局在するかを検証した。

4. 研究成果

(1) まず、急性期と慢性期の低酸素応答で発現が誘導される遺伝子 186 個を、これまでに報告されてきた HIF の標的遺伝子、および、正常細胞と CREB-KD 細胞を比較したアレイ解析、ならびに、RNA-seq 解析で同定した CREB の標的遺伝子の中から、その発現量を指標にして選抜した。

(2) これらの遺伝子の核内配置決定に用いるためのオリゴプローブを専用のソフトウェアを用いて設計した。そのプローブを鋳型として、PCR 法を用いてアダプター配列を付加して、増幅し、カラムを用いて精製し、調製した。ハイスループット解析のためには 384well のイメージングプレートを使用する必要があったことから、このプラットフォームが適切な条件で利用できるように、細胞の密度、低酸素培養の条件、ならびに、プロー

ブの濃度の最適化を行った。

(3) (1)で調製したプローブを、HIF 標的、CREB 直接標的、CREB 間接標的 1、CREB 間接標的 2、および、ネガティブコントロールの 5 群に分類して、各グループに含まれる遺伝子の配置を high-throughput imaging position mapping (HIPMap)法を用いて決定した。

(4) 得られた大量の画像データを自動で識別して判定するソフトウェアの開発と条件設定を、共同研究者らと行い、データ解析のプラットフォームを構築した。

(5) (4)で開発したソフトウェアを用いて、大規模なイメージ画像データを解析した。得られた数値情報から、標的遺伝子の核内での相対位置(radial position)を計算したところ、それぞれの遺伝子は核周辺から核の中央まで、さまざまな分布を示すことが明らかになった。この分布を通常酸素と低酸素で比較したところ、低酸素でその分布を変化させる遺伝子を複数同定することができた(図 1)。

(6) さらに、核内の基準点となる遺伝子を設定して、その遺伝子と各遺伝子の距離(relative position)を計算したところ、その距離は低酸素環境で接近するものと、離反するものが複数存在することが明らかになった。このことから低酸素環境では染色体構造が変化して、各遺伝子はダイナミックに移動していることが明らかになった。

(7) 核内の遺伝子ポジションの変化が認められた低酸素条件において、CREB の細胞内の局在を、蛍光免疫染色法を用いて検証したところ、CREB はこの条件下で核内に一様に局在していることが明らかになった。今後は、低酸素のより詳細な時間経過を追跡し、このような事象が低酸素応答のどのタイミングで起きるのか、さらに、どのくらいの期間にわたって持続するのかを明らかにしたい。また、遺伝子のポジションが遺伝子発現とどのような関係があるのかについても明らかにしたい。さらに、遺伝子の移動に働く分子機序も核内因子のノックダウン実験より解明することをめざす。

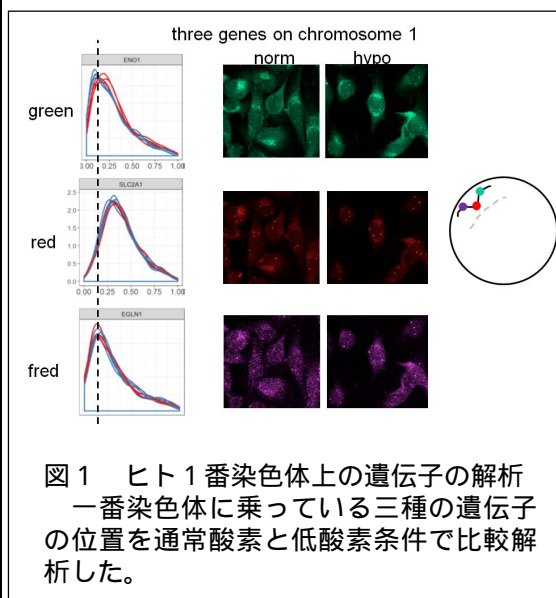


図 1 ヒト 1 番染色体上の遺伝子の解析
一番染色体に乗っている三種の遺伝子の位置を通常酸素と低酸素条件で比較解析した。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) Gudla PR, Nakayama K, Pegoraro G, Misteli T.* SpotLearn: Convolutional Neural Network for Detection of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Signals in High-Throughput Imaging Approaches. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol. (in press)* (2017) doi: 10.1101/sqb.2017.82.033761 (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/advanced/oxy/labo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA, Koh)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号： 10451923

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Dr. Tom Misteli

NIH Distinguished Investigator

国立がん研究所、米国国立衛生研究所